

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

JP-2711786

DIALOG(R) File 352:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009490546 **Image available**

WPI Acc No: 1993-184081/199323

Sphering of blood cells for flow cytometry - by using zwitterionic
sphering agent for compatibility with cationic RNA-staining dyes

Patent Assignee: BAYER CORP (FARB); MOUNT SINAI SCHOOL MEDICINE (MOUN);
MILES INC (MILE); UNIV NEW YORK MT SINAI SCHOOL MEDICINE (UYN)

Inventor: BEN-DAVID D; COLELLA G M; CUPO A; FAN S S; FISCHER G; MARTIN G E;
ORNSTEIN L; OMSTEIN L

Number of Countries: 023 Number of Patents: 015

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 545313	A1	19930609	EP 92120307	A	19921127	199323 B
AU 9228166	A	19930610	AU 9228166	A	19921105	199330
CA 2077790	A	19930606	CA 2077790	A	19920909	199335
US 5284771	A	19940208	US 91802674	A	19911205	199407
JP 6180316	A	19940628	JP 92350138	A	19921204	199430
AU 661728	B	19950803	AU 9228166	A	19921105	199539
TW 265412	A	19951211	TW 93103031	A	19930420	199609
IL 103056	A	19970415	IL 103056	A	19920904	199726
US 5633167	A	19970527	US 91802674	A	19911205	199727
			US 9316323	A	19930211	
			US 94362744	A	19941222	
EP 545313	B1	19970723	EP 92120307	A	19921127	199734
DE 69221086	E	19970904	DE 621086	A	19921127	199741
			EP 92120307	A	19921127	
ES 2104802	T3	19971016	EP 92120307	A	19921127	199748
JP 2711786	B2	19980210	JP 92350138	A	19921204	199811
KR 276145	B	20001215	KR 9223172	A	19921203	200175
CA 2077790	C	20020702	CA 2077790	A	19920909	200253

Priority Applications (No Type Date): US 91802674 A 19911205; US 9316323 A
19930211; US 94362744 A 19941222

Cited Patents: 1.Jnl.Ref: EP 154522; EP 430719; EP 73554; JP 61079163; US
4735504

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 545313 A1 E 29 G01N-033/49

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

AU 9228166 A G01N-001/30

CA 2077790 A G01N-001/28

US 5284771 A 24 G01N-001/30

JP 6180316 A 19 G01N-033/48

AU 661728 B G01N-001/30 Previous Publ. patent AU 9228166

TW 265412 A G01N-033/49

IL 103056 A G01N-033/50

US 5633167 A 23 G01N-033/50 Div ex application US 91802674

Cont of application US 9316323

Div ex patent US 5284771

EP 545313 B1 E 32 G01N-033/49

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

DE 69221086 E G01N-033/49 Based on patent EP 545313

ES 2104802 T3 G01N-033/49 Based on patent EP 545313

JP 2711786 B2 19 G01N-033/48 Previous Publ. patent JP 6180316

KR 276145 B G01N-033/50 Previous Publ. patent KR 93013734

CA 2077790 C E G01N-033/49

Abstract (Basic): EP 545313 A

Mature erythrocytes and reticulocytes in an anticoagulated whole
blood sample are spherized (made spherical) by treating the sample with a
zwitterionic sphering agent, thereby eliminating orientational noise in
flow cytometric light scattering measurements.

Also claimed are flow cytometric processes for identifying subclasses of cells in blood samples on the basis of light scattering and opt. absorption measurements.

USE/ADVANTAGE - Used to distinguish reticulocytes and erythrocytes, or to determine the no., vol., haemoglobin content and RNA content of reticulocytes and erythrocytes. Reticulocyte counts are useful as a diagnostic aid for studying blood dyscrasias, assessing post-haemorrhage red blood cell regeneration and monitoring early toxicity in cancer chemotherapy. Use of a zwitterionic sphering agent avoids incompatibility problems associated with the use of cationic dyes for staining reticulocytes. The sphering agent is a zwitterionic surfactant (I), esp. lauramidopropyl betaine (Ia), N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulphonate, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulphonate, cocoamidopropyl betaine or cocoamido sulphobetaine. The concn. of (I) in the diluted sample is 3.9-148 mcg/ml.

Dwg. 1/8

Abstract (Equivalent): EP 545313 B

A method for treating mammalian red blood cells in a whole blood sample which can be subsequently effectively measured electrooptically, which comprises treating an anticoagulated whole blood sample with a reagent solution containing a zwitterionic surfactant as a sphering agent, said surfactant not requiring added protein buffering to delay red cell lysis and being present in the reagent composition at a concentration which provides substantial sphering of the mature erythrocytes and the reticulocytes in said whole blood sample to eliminate orientational noise when said sample and reagent are subjected to flow cytometric light scattering measurement.

Dwg. 0/8

Abstract (Equivalent): US 5633167 A

Composition for treating mammalian red blood cells in an anticoagulated whole blood sample which can be subsequently effectively measured electrooptically, the composition comprising a zwitterionic surfactant as the sole surfactant which is a sphering agent that eliminates orientational noise when the sample is mixed with the composition and is subsequently subjected to flow cytometric measurement. The surfactant is present at a concentration effective to substantially sphere the mature erythrocytes and the reticulocytes in said whole blood sample, without inducing cell lysis after mixing with the sample for at least 2 minutes. The composition does not include protein buffering or fixative and its pH is 6-9. The composition provides detection and discrimination of red blood cells and reticulocytes in the whole blood sample simultaneous with determination and measurement of haemoglobin content and concentration on a cell-by-cell basis.

Dwg. 0/23

US 5284771 A

Mammalian red blood cells in a whole blood sample are treated by (a) treating an anticoagulated sample with a single reagent soln. contg. a zwitterionic sphering agent to eliminate noise when subjected to flow cytometric light measurements. Sphering agent has no added protein buffering or fixative, and is present in concn. providing sphering of mature erythrocytes and reticulocytes in the sample.

USE/ADVANTAGE - Measurement of haemoglobin content, mean cell vol., mean corpuscular haemoglobin concn. from measured cell-by-cell vol. and haemoglobin concn. Measurement is electrooptical.

Dwg. 0/14

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): G01N-001/28; G01N-001/30; G01N-033/48; G01N-033/49; G01N-033/50

International Patent Class (Additional): C09B-067/44; G01N-015/14; G01N-021/27; G01N-021/49; G01N-021/53; G01N-021/64; G01N-033/52; G01N-033/68; G01N-033/96

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2711786号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月10日

(24) 登録日 平成 9 年(1997)10月31日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48			G 0 1 N 33/48	M
15/14			15/14	C
21/27			21/27	Z
21/64			21/64	Z
33/49			33/49	A

請求項の数22(全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-350138	(73) 特許権者	595152405 パイヤー、コーバレイション アメリカ合衆国ニューヨーク州タリタウン、ベニディクト・アヴィニュー 511 番
(22) 出願日	平成 4 年(1992)12月 4 日	(73) 特許権者	593003329 ザ、マウント、サイナイ、スクール、ア ヴ、メダスン アメリカ合衆国ニューヨーク州10029、 ニューヨーク、グスタヴ・エル・レ ヴィ・ブレイス 1
(65) 公開番号	特開平6-180316	(74) 代理人	弁理士 真田 雄造 (外 1 名)
(43) 公開日	平成 6 年(1994) 6 月28日	審査官	山村 祥子
(31) 優先権主張番号	7 / 8 0 2 6 7 4		
(32) 優先日	1991年12月 5 日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試薬組成物とその細胞球形化への使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 双性イオン球形化剤を含有する単一の試薬溶液中で、非凝固性にされた全血試料を処理することにより、その試料と試薬とを流通式細胞測定用の光測定にかけた場合の方向性の雑音を除去する、全血試料中の哺乳動物赤色血液細胞の処理方法であつて、該球形化剤として、添加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まないものを、全血試料中の成熟赤血球と網状赤血球との実質的球形化を与える濃度で該試薬中に存在させる、該赤色血液細胞を後で効果的に電気光学的に測定できるようにする処理方法。

【請求項 2】 稀釈された試料中の双性イオン球形化剤濃度が約 3. 9 ~ 1 4 8 μ g / m l である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 (a) 双性イオン球形化剤を含むが、添

加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まない、等張の約 0. 5 ~ 2. 0 倍の張度をもつ単一の水性試薬組成物と、血液試料のアリコートとを混合して懸濁液を形成する工程、

(b) 工程 (a) の前記懸濁液を、一時に実質的に 1 個の細胞ずつ、集束された光学的照明領域を通す工程、

(c) 各細胞により散乱された光を検出し測定する工程、及び

(d) 前記の散乱された光の測定された大きさに少なくとも部分的に基いて、関心のある細胞サブクラスを識別する工程、

を含んで成る、流通式細胞測定法による、非凝固性にされた血液試料中の関心のある細胞サブクラスの識別法。

【請求項 4】 工程 (a) が、関心のある細胞サブクラスを選択的に染色する染料化合物を添加することを含み、

(2)

3

工程 (c) が各細胞により散乱される光と吸収される光とを検出し、測定することを含み、そして工程 (d) が前記の散乱および吸収された光との測定された大きさに少なくとも部分的に基いて、関心ある細胞サブクラスを識別することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 (a) 細胞の核酸を染色する染料化合物と、約 6～9 の pH を維持するための非蛋白質 pH 緩衝剤と、添加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まない双性イオン球形化剤とよりなる水性試薬組成物と血液試料のアリコートとを混合して懸濁液を形成する工程、

(b) 工程 (a) の懸濁液を、実質的に 1 時に細胞 1 個ずつ、集束された光学的照明領域を通す工程、

(c) 各細胞により散乱された光と吸収された光とを検出し測定する工程、及び

(d) 前記の散乱および吸収された光の測定された大きさに少なくとも部分的に基いて、関心ある細胞サブクラスを識別する工程、
を含んで成る、流通式細胞測定法による、非凝固性にされた血液試料中の関心ある細胞サブクラスの識別法。

【請求項 6】 工程 (a) に記載の染料化合物がカチオン染料であり、全緩衝剤濃度が等張であって、血液試料中の細胞を等容積的に球形化する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 工程 (a) の球形化剤を、ラウラミドプロピルベタインと N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートと N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートとココアミドプロピルベタインとココアミドスルホベタインとより成る群から選択する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】 (a) 網状赤血球のリボ核酸を染色する有機カチオン染料化合物と、添加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まない双性イオン球形化剤と、非蛋白質緩衝剤溶液とより成る試薬組成物と血液試料のアリコートとを混合して懸濁液を形成する工程、

(b) 工程 (a) の懸濁液を、1 時に実質的に細胞 1 個ずつ、集束した光学的照明領域を通す工程、

(c) 各細胞により散乱された光と吸収された光とを検出し測定する工程、

(d) 前記の散乱および吸収された光との測定された大きさに基き、染色された細胞と染色されていない細胞とを識別する工程、及び

(e) 散乱および吸収された光の測定された大きさに基き、各網状赤血球と赤血球との数と体積とヘモグロビン濃度と RNA 濃度とを決定する工程、
を含んで成る、流通式細胞測定法による、非凝固性にされた全血試料中の網状赤血球と赤血球との特性判別方法。

【請求項 9】 工程 (a) に記載の球形化剤がアルキル

4

ベタインまたはアルキルアミドベタインである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 工程 (a) に記載の球形化剤を、ラウラミドプロピルベタインと N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートと N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートとココアミドプロピルベタインとココアミドスルホベタインとより成る群から選択する、請求項 8 に記載の方法。

10 【請求項 11】 工程 (a) に記載の球形化剤が約 3.9～148 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】 試料と試薬とを流通式細胞測定的光測定にかけた場合の方向性の雑音を除去する球形化剤として、双性イオン界面活性剤を、全血試料中の成熟赤血球と網状赤血球との実質的球形化を与える濃度で含有するが、添加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まない、非凝固性にされた全血試料中の哺乳動物赤色血液細胞を後に効果的に電気光学的に測定できるように処理するための試薬組成物。

20 【請求項 13】 双性イオン界面活性剤の濃度が約 3.9～148 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である、請求項 12 に記載の試薬組成物。

【請求項 14】 pH 値を約 6～9 に維持するための pH 緩衝剤を含む、請求項 12 に記載の試薬組成物。

【請求項 15】 網状赤血球中のリボ核酸を染色するために充分な量の染料化合物と、網状赤血球と赤血球を等容積的に球形化するために充分な量の球形化剤としての双性イオン界面活性剤とを含むが、添加された緩衝用蛋白質も添加された固定剤も含まない、流通式細胞測定法による非凝固性にされた全血試料中の網状赤血球の特定の

30 ための試薬組成物。

【請求項 16】 染料化合物がカチオン染料である、請求項 15 に記載の試薬組成物。

【請求項 17】 等張の約 0.5～2.0 倍の張度をもつ溶液から成る、請求項 15 または 16 に記載の試薬組成物。

【請求項 18】 双性イオン界面活性剤が約 3.9～148 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で存在する、請求項 15 に記載の試薬組成物。

40 【請求項 19】 pH 値を約 6～9 に維持するための pH 緩衝剤を含む、請求項 15 に記載の試薬組成物。

【請求項 20】 双性イオン界面活性剤がアルキルベタインまたはアルキルアミドベタインである、請求項 11～19 のいずれかに記載の試薬組成物。

【請求項 21】 双性イオン界面活性剤を、ラウラミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタインおよびココアミドスルホベタインから成る群から選択する、請求項 20 に記載の試薬組成物。

50 【請求項 22】 双性イオン界面活性剤を、N-テトラ

5

デシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートおよびN-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナートから成る群から選択する、請求項 11~19 のいずれかに記載の試薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は試薬組成物と細胞分析でのその使用、更に特別には、光散乱と吸収および／または蛍光流通式細胞測定 (flow cytometry) 技術による、多数の細胞の体積及び／または蛋白質濃度と蛋白質含有量および／または核酸含有量との改良された電子光学的測定のための全血試料の調製へのその使用とに関する。

【0002】

【先行技術の説明】細胞測定分野、即ち光ビームを用い (通常は種種な顕微鏡を通して) 細胞の相互作用を測定することにより、個々の細胞の性質を定量的に決定する科学の誕生に当り、Caspersson (Caspersson T., Skand. Arch. Physiol., 1936, 73 Suppl. 8, 1-151) は球形細胞の中心に点光源の焦点を合せることによって、細胞を通る凡ての光経路は正確に細胞直径と同じで等しいと云うことを納得したと指摘した。原則的に、このことは細胞の測定された光学密度から、光吸収分子種の濃度の正確な測定を可能にしている (Pollister, A. W. および Ornstein, L., "The Photometric Chemical Analysis of Cell" in Mellors, R. C., Ed., Analytical Cytology, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, 1959, 431-518)。しかし球形でない細胞の完全な球への制御された変換により細胞により散乱された光の流通式細胞測定データの解析が非常に改善出来るまでには約 50 年すぎた (以下に議論される Kim と Ornstein および Tycko を見よ)。本発明のそのような制御された球形化における尚一層の改善は実質的に細胞の制御された球形化の利用を、吸収／散乱流通式細胞測定法による細胞内の少量の吸収分子の鋭敏な測定、並に Tycko 法による、細胞体積と細胞全蛋白質濃度 (あるいは相当して、屈折率、密度または全細胞固形物) の正確な同時測定のためへの使用にまで拡張する。

【0003】凡ての高等動物においては、血液は種種な小体、赤色血液細胞 (赤血球) と白色血液細胞 (白血球) と血小板とが懸濁されている水性流体部分 (血漿) から成る。血漿は、大約水 90%、蛋白質 0.9% および痕跡の他の材料例えば糖、尿素、尿酸などより成る組成を持っている。

【0004】末梢血液 (即ち、骨髓外部の血液) の細胞

(3)

6

あるいは小体は 2 つの主要な群、酸素の輸送を主要目的とする赤血球と主要機能が免疫システムおよび体に異質な材料の破壊に関する白血球とに分けられる。この 2 つの主要な群に加えて、血液はまた止血で重要な所謂血小板を含有する。

【0005】赤血球の成熟の最終段階はそれが骨髓から離れた後、末梢血液中を循環し乍ら起る。これらの若い赤色細胞即ち“網赤血球” (以下、網赤血球とも言う) は核を失い、従って分裂する、あるいはリボ核酸

(RNA) を合成する能力を失う。これらの機能は止むけれども、網赤血球は未だ代謝的には活性であり、しばらく、蛋白質を合成し、ヘム合成のため鉄を取り込みそしてエネルギー豊富な状態を維持するのに必要な代謝反応を行うことができる。これらの細胞は通常、網赤血球中のアニオン性の RNA と反応し、網赤血球中の、網赤血球にその名を与える、細いあるいは粗い染色された“細網”中に沈澱するカチオン染料溶液にそれらの細胞を曝すことにより、容易に成熟赤血球から区別される。

【0006】網赤血球は正常では全赤色血液細胞個体群の約 0.5~2% 含まれているが、この百分率は、異常状態では劇的に変り得る。例えば網赤血球数は長年、血液疾患を研究する場合の診断学的助けとして、そして出血に引続く赤色血液細胞再生の指数として、並にある種の悪性疾患の化学療法における早期の毒性の監視のために用いられて来た。

【0007】核酸 (RNA と DNA) は実際上どんなカチオン染料でも染色できるポリアニオンである。網赤血球中の RNA はほんの少しのカチオン染料 (ブリリアントクレジルブルー (BCG) とニューメチレンブルー (NMB) とオーラミン O (AuO) とアクリジンオレンジ (AO) とチアゾールオレンジ (TO) とピロニ Y (PY) とを含む) でだけ染色できる。その部分集合は NMB と AO とを含む。網赤血球染色の速さと度合いとは染料の細胞外濃度と網赤血球膜を通しての染料の透過速度と、そのカチオン染料と網赤血球 RNA との間の特異的結合恒数の強さとに左右される。後 2 者の性質は異っていて各染料について容易には予言できず、それ故有用な網赤血球染色を発見するには試行錯誤が必要である。凡てのカチオン物質が本来の赤色細胞 (および網赤血球) 膜を透過できるわけではなく、必然的にカチオンを伴うアニオンの本性がそのカチオン物質が速かに、遅くあるいは全く透過するか、しないかに影響し得る。疎水性分子は一般に親水性分子より速く赤色細胞膜を透過し、小さい分子は一般に大きい分子より速く膜を透過する。網赤血球を染色できるカチオン染料と混合された塩または緩衝剤の部分集団のみが迅速な染色を可能にし、即ち、“醜った”緩衝剤とでは“正しい”染料でも網赤血球を染色するに“永久の”時間がかかる。又再び、網赤血球染色混合物の有用な処方を発見するには試行錯誤が必要である。それ故、指針として用いることができる

(4)

7

種々な“法則”にも拘らず、特別なカチオン染料が速かに透過し、網赤血球を染色するかどうか、どう云う条件の下で速に透過し、染色するかを直観的に予見することは未だ出来ない。

【0008】流通式細胞測定法の基礎的な概念は本質的に、細胞を1時に1つ特異的センシング領域を通過させることである。典型的には、水力学的集束の方法により、単一の細胞を、集束されている光源と、散乱、吸収または蛍光を発した光の測定のための検出システムとから成るセンシング帯を通過させる。

【0009】粒子がさえぎる光に対する影響は多くの方法で検出できる。一般に粒子はそれが懸濁している媒質の屈折率とは異なる屈折率を持っている。それ故、それはそれが照明されている光を、ある範囲の角度を通し、そして屈折率差と粒子寸法とその形と屈折率における内部変化と構造並に照明する光の波長とに左右されるさまざまな強度で散乱することになる。(均一な球に対しては、Mie 散乱理論が散乱光の分布と強度とに関し完全な記述を与える。) 粒子はまた入射光の或る程度を吸収してもよい。後者の場合、吸収された光の一部は、典型的には吸収光の波長より長い波長で蛍光として再放射されてもよい。

【0010】これらおよび他の影響は散乱された光と散乱されない光と蛍光との種々な角度間隔を測定するために備えられている光検出器で測定できる。

【0011】粒子が細胞程、典型的には直径 $15\mu\text{m}$ 以下程に小さい場合、高速での(典型的には広く間隔をあけられた細胞毎秒数100~数1000個)通過により影響され、そして特に懸濁液流の照明されている部分に落ちる毎秒当りの光子数に比較した。(そして吸収検出器(および蛍光検出器)のバックグラウンド照明に比較して)照明ビーム中の光子数は非常に小であり得る。それ故粒子間の小さい特別な差異検出感度の限界は決定的には光子流束(少くとも光源の本来の“輝度”に左右される)と粒子間の他の大小の差により生ずる光子流束の揺動がどれ程大きいかににより左右される。

【0012】吸収、散乱および蛍光流通式細胞測定信号における妨害雑音の主要な源は各種の信号に対して全く違う可能性がある。第1次近似で染色された細胞または染色されていない細胞からの蛍光信号の大きさは、信号を生じさせる細胞の形または方向によりほとんど影響されないが、散乱と吸収との信号は形と方向とにより非常に強く影響される。極端な例として、人赤血球の生来の両凹形はそれが発生する吸収および散乱信号に対し深刻な影響を持ち、典型的な、古典的に染色した網赤血球の小さい吸収信号より大きく影響する(図14~図17を参照)。この事が本発明以前には、網赤血球の計数あるいは一般的には、細胞中の低濃度の吸収分子の測定に関し、吸収流通式細胞測定法が有用でなかった主な理由である。他方、細胞中または(例えば未結合の蛍光染料)

8

周囲の媒質中の弱い蛍光材料は吸収または散乱信号に対して実質的には影響しない。

【0013】全血の抗凝固性にされた試料中の網赤血球の百分率の計数に用い得る幾つかの半自動化された方法が利用できる。現在の各方法においては、網赤血球内のRNA染色のために、有機カチオン染料例えばAO, AuOまたはTOを含有する希釈剤が用いられる。その染料は細胞膜を透過し、RNAと結合し、そして通常各網赤血球中の“細網”を沈殿させる。染色されたRNAからの信号量は大約で、RNA含有量に比例する。適当な染色後、適当な励起光源(典型的には488nmで発光するアルゴンイオンレーザー)と発光検出システムとを備えた蛍光流通式細胞測定器が流出液中の網赤血球百分率決定のために使用できる。

【0014】蛍光染料と流通式細胞測定法とを用いる、全血試料中の網赤血球の弁別のための説明的方法がこの特許の文献中で公開されている。

【0015】例えばAdamsとKament skyとの米国特許第3,684,377号は人血に対し正常の生理学的範囲にあるpHと浸透圧モル濃度を持つ、アクリジンオレンジの水性溶液を含む、特異血液分析用染料組成物を公開している。その染料組成物は赤血球散乱信号と共に、蛍光信号の存在あるいは不存在を測定することにより網赤血球を計数することに用いることができる。

【0016】Adamsの米国特許第3,883,247号は、濃度 10^{-6} ~ 10^{-5}g/ml でアクリジンオレンジを含む染料組成物を用いる、AdamsとKament skyとの方法と同様の方法を公開している。

【0017】Nataleの米国特許第4,336,029号はpH約7.4で等張浸透圧モル濃度の、染料AOとクエン酸イオンとパラホルムアルデヒドとの水性溶液よりなる試薬組成物を公開している。その種々な成分の濃度は網赤血球と血小板との染料取込みを最大とするように選択され、染料取込みが血液試料と試薬組成物との混合2~5分以内に達成するようにされる。Natale試薬を利用する血小板と網赤血球との検出のための自動化された方法はGershman等の米国特許第4,325,706号に公開されている。

【0018】Sage, Jr. 米国特許第4,707,451号中で公開されている試薬において、網赤血球はチオフラビンTまたはクリスアニリンで染色される。全血試料は、等張食塩水中の染料(0.2mg/ml)の25 μl アリコートと抗凝固性にされた全血10 μl とを混合し、その混合物を約7分間培養することにより効果的に染色されることが見出された。

【0019】Lee等の米国特許第4,883,867号はRNAまたはDNAの染色のための染料組成物を公開している。その染色組成物は好ましい染料化合物としてTOを含んでいる。網赤血球は最低30分で染色され

9

る。

【0020】流通式細胞測定技術での網赤血球計数用試薬がKurodaの米国特許第4,971,917号に記載されていて、それには染料例えばAuOによる成熟赤血球の非特異的染色を減少させるため、蛍光流通式細胞測定法により分析する場合成熟赤血球を間違えて網赤血球として計数するのを防止するため炭酸塩が含有されている。

【0021】米国特許第4,981,803号は、2つの溶液、即ち染料AuOを非水性溶剤中に溶解している染色用原溶液と最適染色条件を満足させる緩衝剤溶液とから成る、網赤血球計数用試薬を記載している。

【0022】AuOを含む、蛍光流通式細胞測定技術用の他の網赤血球染色試薬がKurodaの米国特許第4,985,174号で公開されている。この文献は20秒と20分とのどんな時間でもよい試薬と試料との培養時間を教えている。

【0023】上記の如く小さい部分集団のカチオン染料のみが網赤血球を選択的に染色し、更に小さい部分集団のものだけが速かに網赤血球を透過する。本発明のカチオン染料化合物は5分以内で網赤血球を染色し、それ故流通式細胞測定法による網赤血球分析を、血液試料と試薬組成物との1緒にした混合後短時間で行うことが出来る故に本発明を自動化された手順に容易に適合させる。

【0024】文献でここに取り入れられている、“化合物と試薬組成物と全血中の網赤血球の定量測定へのその利用”と題する、1989年12月1日FanとFischerとにより出願された同時係属米国特許出願第07/444,255号(米国特許第5,075,556号)に、網赤血球定量のための4級化されているAO誘導体が記載されている。Fan等の試薬はパラホルムアルデヒドと蓚酸カリウムとを含む緩衝剤溶液中に、AO誘導体 10^{-6} g/ml含有する。この試薬組成物は網赤血球を染色し、血液試料中の網赤血球の定量的蛍光流通式細胞測定分析を可能にする。この試薬も前記の試薬のどれも、以下で議論するような方向雑音問題を防止するために球形化剤を含有せず、そして他の診断学的に重要なパラメーター例えば細胞1つずつに基く網赤血球と赤血球との体積とヘモグロビン濃度との同時決定を可能にしていない。

【0025】ShapiroとStevensとはFlow Cytometry of DNA Content Using Oxazin 750 or Related Laser Dyes Witlir 633nm Excitation, Cytometry, 第7巻、107-110頁(1986)において、流通式細胞測定によるDNA含有量の測定に対しオキサジン750の使用を公開している。細胞はオキサジン750 10~30 μ Mにより染色され、DNA測定にはエタノールを添加して固定される。ShapiroとSteve

(5)

10

nsとはオキサジン750はRNAは染色しない様であると主張している。その上、オキサジン750を用いる実験案は網赤血球の計数、あるいは細胞1つずつに基く、他の診断学的に重要な赤色血液細胞パラメーター例えば体積とヘモグロビン濃度との同時測定を可能にしている。

【0026】前記の如く、吸収または散乱光流通式細胞測定器の使用を通じての網赤血球定量の不利な点は方向雑音と網赤血球信号との間を弁別する能力がないことである。人および多くの他の哺乳動物赤色血液細胞は両面がへこんだ円盤の形をもっている。その様な非対称赤色血液細胞により散乱される光の量は、細胞の方向に従って変る。それ故全く同一の2個の赤色血液細胞であっても、それらが検出器のセンシング帯を通過する時に同一の方向を向いていないと、非常に異なる散乱光および吸収信号が発生することになる。その結果正常な赤色細胞に関する散乱並に吸収信号の大きさの分布は非常に広く、2つのモードがあることになる(図14及び図15を参照)。この方向の違いによる分布の広がりを、本明細書では方向性の雑音又は方向性雑音と言う。一方のみに少量の染色された細網が存在するという点を除けば他の点では同一の2個の赤色血液細胞でも、一般に異なる方向を向いているので散乱光および吸収検出器に大きい信号差すなわち方向性雑音が生じてしまい、染色された細網の存在により発生されるであろう非常に小さい信号差はこの大きい方向性雑音中に埋没してしまう。

【0027】KimとOrnsteinとの米国特許第4,575,490および4,410,004号とは流通式細胞測定器における赤色血液細胞の体積の測定での方向雑音方法を教えている。その方法は細胞体積のより一層精密で正確な測定を可能にするため、細胞間のいかなる方向差異を除去するのに、未染色赤色血液細胞の等積的球形化を組入れている。各赤色血液細胞は界面活性剤球形化剤により両凹形から完全な球へ変換される。赤血球の溶血防止のため、その球形化剤と共に“緩衝する”蛋白質および/またはアルデヒド固定剤が用いられる。KimとOrnsteinとにより記載されているアニオン界面活性剤は、アニオン界面活性剤が細網を染色し、沈澱するのに用いられるカチオン染料と速かに反応し、沈澱することが見出されている故に、網赤血球染色には用いることができない。

【0028】Tyckoの米国特許第4,735,504号は、抗凝固性にされている全血試料中の赤血球の、個別および平均の赤血球体積(MCV)と個別および平均の小体ヘモグロビン濃度(MCHC)とを測定する完全自動化法と手段とを提供する流通式細胞測定器であるTECHNICON H¹1システムの赤色血液細胞チャネルを公開している。この方法においては、全血試料の2 μ lアリコート中の赤色血液細胞をまず希釈し、それからKimとOrnsteinとの今記載した方法を

(6)

11

用いて等積的に球形化する。20 秒間培養後これらの細胞を、本質的には 1 時に 1 個、その分析器の赤色細胞チャンネル内の照明されている測定帯を通過させる。2 つの隔離した角度間隔中の、これらの細胞により散乱された光の大きさを測定する。この適用においては光源と検出角度との選択が決定的である。光源が 633 nm の光を発光するヘリウムネオンレーザーである場合、2 つの散乱光捕集角度間隔は 2~3 度 (2° - 3°) と 5~15 度 (5° - 15°) である。各間隔の散乱光水準が 1 つの細胞について知れば、その細胞の体積とヘモグロビン濃度とは Mie の散乱理論で予言される値と比較して決定される。各細胞の体積 (V) とヘモグロビン濃度 (HC) とはメモリーに記憶され、MCV と MCHC とは試料測定サイクル終了時、Tycko で議論されているごとく、技術で既知の技術により計算される。V および HC 分布サイトグラムおよび V および HC ヒストグラムはこの計算を用いて作られる。

【0029】上記の方法のどれも網赤血球と非網赤血球とを区別しないし、実施されている前記の方法は細胞 1 つずつに基いて、網赤血球と赤血球との診断学的に重要なパラメーター例えば体積とヘモグロビン濃度とを別別に決定するには用いることができない。

【0030】流通式細胞測定器による網赤血球数の監視における困難性の他の 1 つは網赤血球検出信号と成熟赤色血液信号とシステム雑音との弁別の困難さである。若い網赤血球中には RNA の染色された線状体が多く流通式細胞測定器により検出する場合相対的に大きい大きさの信号を発生する。しかしより一層成熟した細胞はより少ない、染色された RNA を含有し、流通式細胞測定システムにより遮蔽されてもより小さい信号を発生させる。

【0031】光散乱と吸収または蛍光流通式細胞測定技術による、全血試料中の網赤血球の同定と、網赤血球および赤血球の体積とヘモグロビン濃度とヘモグロビン含有量との同時で個別での測定のために有用な方法と試薬との必要性が存在している。

【0032】我々は細網染色のための公知の技術の変形中でカチオン染料を用いたと云う前提で出発した。また、我々は網赤血球検出のために、蛍光および/または吸収を利用できるであろう流通式細胞測定法を開発するのに関心があった。その上、吸収の場合には、方向雑音除去のために赤色細胞の球形化を用いたかった (図 16 及び図 17 を参照)。(若し元の細胞体積を同時に回収し、精密に測定することに関心がなければ、殆んどの方

12

とができることを希望した。(若し球形化が完全であれば、等容積的であっても、X が約 0.5 から 2 {0.15 から 0.60 Osm} に変る等張性に関する或る既知の係数 X を使って、体積に関しては $1/X$ での補正、そして蛋白質 (例えばヘモグロビン) 濃度に関しては X での補正をする Tycko 法により、元の値を計算出来ることに注意)

【0033】これらの発明は、本願と同日に出願された別の 2 件の特許出願の主題であり、その内容を引用により参照する。

【0034】Tycko の方法の利用には、ヘモグロビンが非常に透明な領域で単色光を発光する光源が必要であり、典型的には赤色ヘリウムネオン (HeNe) レーザーあるいはより長波長でさえあるレーザーのような光源である。このことは、若しその波長が吸収測定にも用いられるならば、その染料は赤色光を強く吸収する青色染料でなければならないことを意味する。

【0035】我々カチオン染料との相容性のため、そして Kim と Ornstein との教えにより示唆されるような赤色細胞球形化剤として非イオン、カチオン並に双性イオン界面活性剤を探索した。Kim と Ornstein との方法におけるごとく、我々は、赤色細胞溶血をおくするため、界面活性剤濃度を“緩衝する”蛋白質 (典型的には牛血清アルブミン) を用いた。多数のそのような界面活性剤 (例えば Triton X100 とラウリルプロピルアミドベタイン) が満足に働いた。我々はラウリルプロピルアミドベタインと幾つかの他の双性イオン界面活性剤 (例えば DAPS と TDAPS) が、赤色細胞溶血をおくらすために緩衝する蛋白質を必要とせず、Kim と Ornstein との方法のための、凡ての種類の血液細胞に対して理想的な他の球形化剤であることを見出した。それは緩衝する蛋白質を必要としない故に、安定で、より簡単な試薬の製造を可能にする。

(Kim と Ornstein との固定段階は最早必須でなく、代りに蛋白質含有試薬中における細菌増殖の問題がさけられる。)

【0036】

【本発明の要約】従って方向雑音低減または除去のため、血液試料中の細胞を球形化するための改良された試薬組成物と方法とを提供することが本発明の主要目的である。

【0037】本発明の他の目的は赤色血液細胞の球形化のための、前記のごとき試薬組成物と方法とを提供することにある。

【0038】尚本発明の他の目的は赤色血液細胞と網赤血球とを同時に球形化し、網赤血球を染色するための、前記のような試薬組成物と方法とを提供することにある。

【0039】本発明の更にその上の目的は吸収並に散乱光流通式細胞測定法による、全血試料中の網赤血球と赤

(7)

13

血球との体積とヘモグロビン濃度とヘモグロビン含有量とを同時に決定するための、前記のような試薬組成物と方法とを提供することにある。

【0040】本発明の尚更に他の目的は関心ある細胞サブクラスと他の細胞サブクラスとを弁別する方法を提供することにある。本明細書において細胞サブクラスとは血液中の細胞の部分母集団を意味する。たとえば全血球を母集団とすれば赤血球はそのサブクラスであり、網赤血球はそのまたサブクラスである。従って本発明のこの目的には、血液試料中の赤色血液細胞と網赤血球とのお

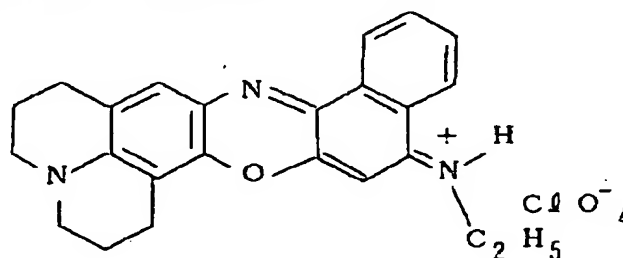
* 10

14

* のおのの間を同時に区別し、計数し、細胞1つずつに基いての測定値から決定された各細胞型の体積とヘモグロビン含有量とヘモグロビン濃度と平均赤血球体積と平均小体ヘモグロビン濃度とを決定するための、前記のような試薬組成物と方法とを提供することが含まれる。

【0041】本発明の1つの態様に従えば、試薬組成物は網赤血球を染色するための有機カチオン染料と約6～9のpHを維持するための緩衝剤溶液とを含んでいる。その染料は構造式

【化1】



を持つ青色吸収染料オキサジン750（「オキサジン7

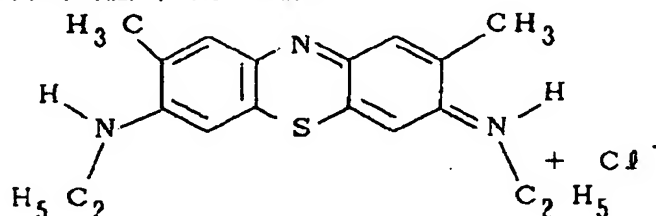
※造式

50」は商品名であり、Exciton, Inc. of

20

【化2】

Dayton, Ohioより入手可能）、あるいは構※



を持つ青色吸収染料ニューメチレンブルーであってもよい。

【0042】試薬組成物の緩衝システムはその試薬組成物のpHを約6～9に維持するのに適当な緩衝剤を含む。その溶液はKClまたはNaClを用いて約250～330mOsmに調節された最終浸透圧モル濃度を持ち、以下の成分の1つまたはそれ以上を記載の濃度で含んでいてもよい。

成分	濃度 (mM)
K/Na HCO ₃	5-50
Mg Cl ₂	0-88
KCl	4-104
Na ₃ PO ₄	0-1.5
CaCl ₂	1-0.6

【0043】好ましくは、その溶液は試薬組成物のpHを約7～8に維持するように処方され、以下の成分の1つまたはそれ以上を記載の濃度範囲で含んでいてもよく、約280～300mOsmの浸透圧モル濃度を維持する。

30

成分	濃度 (mM)
Tris/TEA	0-150
K ₂ Ox/EDTA	0-121
KCl/NaCl	0-155

40

【0044】試薬組成物は染料の赤色細胞膜透過助長のために或るアニオンとカチオンとを含有すべきことが見出された。そのようなアニオンには重炭酸イオン、塩素イオン、硼酸イオン、バルビタール、蔞酸イオン(OX)またはエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)が含まれてもよい。しかし、凡てのアニオンが細胞膜を通じての染料の透過を促進するのに有効であるわけではない。例えば次のアニオン、リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、リン酸イオンの1つまたはそれ以上が唯一の主要アニオンとして試料組成物中に含まれている場合、網赤血球と赤血球との間を、若しあっても僅しか区別しない。あり得るカチオンにはカリウムイオン、ナトリウムイオン、トリスヒドロキシメチルアミノ(Tris)またはトリエタノールアミン(TEA)が含まれる。

50

【0045】この試薬組成物は散乱/吸収流通式細胞測定法技術を用いて、全血試料中の網赤血球を同定するのに用いてもよい。その最も広い適用における方法には全

(8)

15

血のアリコートと前記試薬組成物の 1 つとを混合することを含む。適当な培養期間後、試料／試薬混合物を 1 時に細胞 1 個で、流通式細胞測定器の特別なセンシング領域を通過させる。水力学的集束の方法で、単一細胞がそのセンシング帯を通過させられ、そこで適当な照明波長を持つ集光された光源により照明される。少くとも 1 つの散乱光信号と少くとも 1 つの吸収信号とが細胞 1 つずつに基き測定される。これらの測定から、網赤血球を赤血球から区別できる。

【0046】本発明の好ましい態様に従えば、前記試薬組成物は更にその上、赤色血液細胞と網赤血球とを等積的に球形化するために、双性イオン界面活性剤を含む。この双性イオン球形化剤は好ましくはアルキルアミドベタインまたはアルキルベタイン例えばラウラミドプロピルベタイン (LAB)、ココアミドプロピルベタイン (CAPB) およびココアミドスルホベタイン (CASB) である。他の好ましい球形化剤は N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナート (TDAPS) と N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナート (DDAPS) である。TDAPS と DDAPS とは、それらが最も安定な試料調製を与える故に最も好ましい球形化剤である。

【0047】血液試料中の網赤血球と赤色血液細胞とを効果的に等積球形化するためには、試薬組成物中の球形化剤濃度は約 $3.9 \sim 148 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。球形化剤は好ましくは LAB 約 $12 \sim 87.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、TDAPS 約 $3.9 \sim 11.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、DDAPS 約 $49.3 \sim 148 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、CAPB 約 $8.8 \sim 17.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ または CASB 約 $12.5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{ml}$ の量で存在する。

【0048】前記の緩衝システムの存在の下で、RNA 染色のために必要な、試薬組成物中のニューメチレンブルー濃度は約 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にある。

【0049】例えば我々は、前記の緩衝システムの存在の下で、RNA 染色のために必要な、試薬組成物中のオキサジン 750 濃度は低く、即ち約 $2 \sim 15 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にあり、緩衝剤で増大された透過により網赤血球中の RNA の染料染色は 5 分以内になることを見出した。染料のそのような低濃度は成熟赤血球の非網赤血球染色を最小にし、それが雑音バックグラウンドからの信号の良好な分離となる。そのような速かな染色はこの試薬組成物を自動化された方法へ非常に適合させる。

【0050】この全血／試薬組成物混合物が流通式細胞測定器のセンシング領域を通過する時、各細胞により散乱および吸収された光が測定され、赤血球が網赤血球から区別でき、各網赤血球または赤血球の体積とヘモグロビン濃度が決定される。網赤血球と赤血球との数および網赤血球または赤血球のヘモグロビン含有量と平均細胞体積と平均小体ヘモグロビン濃度と平均細胞ヘモグロ

16

ビンとが測定された細胞 1 つずつの体積とヘモグロビン濃度とから計算される。

【0051】従って、本発明は以下に記載の組成物と方法とより成り、本発明の範囲は請求事項に示される。

【0052】

【好ましい態様の説明】図 1 及び図 2 を参照すると、本発明の原理を実行するのに用いてもよい流通式細胞測定装置の部分の様式化された機能および構造の描字を示している。事実、装置は、出願人より販売されている商標 TECHNICON H' 1 の下に市場で入手できるシステムの変形である特別なシステムを描いている。

【0053】装置は細胞分析用の流通式細胞測定法の原理を組み入れている、特異な型の照明に対する光散乱および光吸収の応答を知覚する能力を含んでいる。本発明に就いて主要な関心のある構成要素のみが示されている。それ故図面は装置の種々な構成要素を動かし、制御するのに必要な機械的および電気的構成要素、即ちモーター、ソレノイド、ポンプ、弁、センサーの凡ては説明していない。これらの構成要素の凡てはどんな既知の在来の型を持っていてもよく、それは意図する方法で試料を処理するための、本発明に従う流通式細胞測定装置中の種々な構成要素の所望の型の操作に関し、以後支えられる情報の知識を持つこの技術において正常な熟達さをもつ人により容易に実現できるものである。

【0054】最も一般的な用語で記載すれば、シース流れ流通セル (sheath-stream flow cell) とこれを支持する水力学的手段により調製された細胞を測定点に運ぶ。その細胞は流通セルの正方形断面流通チャネルに対し、中央にある円筒状体積に局限されている。流通セル構造は TECHNICON H' 1 システム中に用いられるものと同一である。水力学的システムは全く簡単で、唯 2 つの蠕動ポンプとそれについている管とより成る。シースポンプ (Sheath Pump) と管とは $1.6 \times 10^{-7} \text{m}^3/\text{sec}$ の速さでシース (さや) を送り、試料は $3.5 \times 10^{-10} \text{m}^3/\text{sec}$ の速さで運ばれる。流通セル中の流通チャネルは $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ である。シース流れ中軸方向に流れる、得られる円筒状試料流れは直径 $7 \mu\text{m}$ で、速さ $2.5 \text{m}/\text{s}$ を持つ。

【0055】第 1 の目標は TECHNICON H' 1 システムにより提供されている 2 つの赤色細胞散乱チャネルに加えて、吸収測定を支持することになる光学システムを提供することにある。散乱／吸収流通式細胞測定器の光学システムは一般的には 2 つの副次システム

(a) 照明光学系 (図 1) と (b) 検出光学系 (図 2) に分けることができる。

【0056】図 1 を参照すると、照明光学システムは一般的に参照番号 10 で示されていて、 633nm で光の 2mW のビームを照射するヘリウム-ネオンレーザー 12 を組込んでいる。そのビームはレーザービームの位置

(9)

17

を調節するための2つの反射鏡14と16とで折れ曲げられる。その調節でビーム軸を照明光学系の物理的光学軸と一致させることができる。それからそのビームを1対の円柱レンズ18と20とにより $192 \times 77 \mu\text{m}$ の楕円形状のビーム ($1/e^2$ において) に形づくる。 $192 \mu\text{m}$ の寸法は焦点距離150mmの円柱レンズ18で形成され、それはA-1孔口22の長軸 (それは図1中のページ面に平行) を照明する。 $77 \mu\text{m}$ の寸法は焦点距離60mmの円柱レンズ20により形成され、A-1孔口の短軸を照明する。A-1孔口は $653 \times 89 \mu\text{m}$ である。照明二重レンズ23は流通セル24中に $37.4 \times 12.6 \mu\text{m}$ の楕円形に形成されたガウス強度分布を作る。楕円の短軸は垂直である流れの方向に平行で、即ち矢印26の方向にある。

【0057】測定体積を通過する細胞は入射輻射線を散乱および吸収する。散乱および吸収された光は図2中に略図で説明されている検出光学系に捕捉され、測定される。散乱されない光および 19.5° までに散乱される光とは高開口数 (High-NA) レンズ28により集光され、平行にされる。そのビームは $30/70$ (30%反射、70%透過) ビームスプリッター30により2つの部分に分割される。ビーム32はフォトダイオード上に反射され、吸収測定のために用いられ、一方透過されたビーム34は更に $20/80$ (20%反射、80%透過) ビームスプリッター36で分割され、2つの散乱チャンネルを作る。反射された散乱チャンネル38は $5-15^\circ$ 絞り40を持ち、一方透過チャンネル42は $2-3^\circ$ 絞り44を持っている。これらの絞り40、44をおおの通過した光はレンズ46と48とを通り、それぞれフォトダイオード50と52との上に焦点を結ぶ。濃度フィルター54と56と57とは各フォトダイオードでの光水準を標準の検出器と前置増巾器とに適当な水準まで低下させるのに用いられる。

【0058】ビーム32はレンズ58を通じ検出器/前置増巾器60の上に焦点が結ばれる。前置増巾器出力はシステムを通して伝導される光学的力に比例する。それは散乱されていない光と、約 19.5° までの角度に散乱された光とを集める。この角度間隔内に球形化された赤血球と網赤血球とにより散乱された光の約98%が集光される。

【0059】市場で入手できるTECHNICON H' 1機器の吸収チャンネルは細胞吸収には最適化されていない。吸収信号は吸収前置増巾器上の雑音と同水準である。吸収検出手順の数学的モデルが開発された。このモデルは、信号は流通セル中のレーザーによる照明面積の減少につれて劇的に改善されるであろうことを予言した。スリットの寸法を見掛け $150 \times 20 \mu\text{m}$ (TECHNICON H' 1システムにおいて) から見掛け $40 \times 20 \mu\text{m}$ に減少させてS/N比とを係数3.75も増加させた。

18

【0060】吸収前置増巾器からの信号 (パルス高さ) は $20 \sim 50 \text{ mV}$ である。これは処理エレクトロニクスが要求する信号より非常に小さい。利得約25の吸収前置増巾器に第2の利得ステージが加えられた。これがパルス高さを約1Vにした。

【0061】各散乱チャンネルにおける前置増巾器回路の利得と濃度フィルターの光学密度とは (Technicon (TCN) 光学試験材料 (OTM, TCN T03-1704) を検定する場合、約2Vの平均パルス信号水準を生ずるように選択した。OTMは球形化され、堅く固定された赤色血液細胞より成る。この材料はこの出願人から市場で入手でき、TECHNICON H' 1システムでの使用に適合している。それから、これは後段検出信号処理ハードウェアに可変利得増巾器を用いて、各チャンネルの総括利得の細い調節を可能にさせる。

【0062】後段検出信号処理システムの機能ブロック図を図3に示す。このシステムは前置増巾器62と可変利得増巾器64とパルス高さ分析器66とアナログーデジタル変換器68とデータ取得ハードウェア (コンピュータ) 70とソフトウェアとより成る。

【0063】このシステムのための電子工学システムは大部分Howard Shapiro, M. D., D. C. Cambridge, MA, から入手できる4Cyteシステム (4Cyte Model FE Front Endおよび4Cyte Model I Interface Card) より成る。パルス高さ分析器とアナログーデジタル変換器とデータ取得ソフトウェアとは4Cyteシステムの凡ての構成要素である。これらの構成要素は4つの入力信号までのパルス高さを表わす保持パルスを作り出し、“妥当な”パルス高さしきい水準を決めることを可能にする。4Cyteインターフェースカードは4つまでの入力信号のアナログーデジタル変換と、ホストコンピュータのRAMメモリー中へのこれらの値の捕獲とに関する4Cyteソフトウェアと1緒に用いられる。デジタル化された信号は一覧表形式に記憶される。各細胞に関して、測定された4つのパラメーターのおおのに対して1つと、フラグging (flagging) に対して1つとの5つの8ビットバイトの情報がある。これらの実験のためのホストコンピュータはカラーモニターとマッチ副処理器 (match coprocessor) を備えているIBM PC/XTクローンである。データ整理はIBMに相応するどんなコンピュータでも行い得る。

【0064】以下の実施例は試薬組成物と、吸収流通式細胞測定技術を用いる、網赤血球の同定と、網赤血球と赤色血液細胞との特性表示のための、同じ試薬組成物を組込んだ方法とを説明する。可能な場合には標準的な、市場で入手できる試薬級材料を用いた。次の処方と手順とは唯説明の目的のために提供されていること、および本発明の開示に従い他の成分と割合と手順とが採用でき

(10)

19

ることは理解できよう。

【0065】

【実施例 1】本発明の試薬組成物と方法とを用いる、血液試料中の網赤血球と赤血球との区別のための散乱並に吸収測定

オキサジン 750 は 1 mg/ml N, N-ジメチルホルムアミド原溶液中に貯える。作業試薬はその染料原液を、次の成分を記載の濃度で含有する緩衝剤溶液に加えて作る。

オキサジン 750	$6 \mu\text{g/ml}$
塩化カルシウム	0.3 mM
塩化カリウム	4.0 mM
塩化マグネシウム	88.0 mM
リン酸ナトリウム (三塩基)	0.5 mM
重炭酸ナトリウム	20.0 mM

【0066】この研究に用いた作業試薬の最終浸透圧モル濃度と pH とはそれぞれ 272 mmol/kg と 8.1 であった。

【0067】試料は自働化された TECHNICON H' 1 システムの赤色細胞試料処理計画をまねた方法で手で混合した。ガラス試験管に作業試薬 5 ml を満す。それから血液試料 $5 \mu\text{l}$ を、試薬を渦流混合機上で攪拌し乍らピペットでその試薬に入れる。血液の $1:1000$ 希釈液を流通式細胞測定装置の試料ラインに挿入する。約 2 分間以内に試料は流通セルを通過し、赤血球と網赤血球との分析のためのヘリウム-ネオンレーザー光源に曝される。各試料はその体積が許すならば 2 回測定する。顕微鏡調査では、この混合物中の殆ど全ての細胞は部分的に球形化されていることが示めされた。

【0068】分析が終ると、粗データは赤色散乱対赤色吸収サイトグラムの形、図 4 に表示される。明瞭な細胞個体群がその特別な散乱と吸収との信号に基いて明らかに観察される。赤色球個体群は縦軸と垂直線 X との間の領域 A 中に落ちる。これらの細胞は高い散乱信号と低い細胞吸収信号とを示す。網赤血球の大部分は X の右の領域、領域 B に落ちる。これらの細胞はそのオキサジン 750 染色 RNA からの、より高い吸収信号により成熟赤血球と区別できる。血小板個体群は線 Y 以下の領域 C 中にあり、共在領域は線 Z の上の領域 D にある。血小板は網赤血球に比較すると相対的に低い散乱信号をもつ。

【0069】成熟赤血球と網赤血球との間の吸収区画に基き、網赤血球と赤血球とを同定する散乱光と吸収との領域を定める電子工学的“窓”を創ることにより患者試料の網赤血球数を決定してもよい。各“窓”内に落ちる網赤血球と成熟赤血球の数が決定され、それで全細胞個体群中に存在する網赤血球と赤血球との百分率が計算される。図 4 の (1) においては、網赤血球“窓”は領域 B で、成熟赤血球“窓”は領域 A で定められている。図 4 の (2) および凡ての以下の散乱/散乱サイトグラムにおいて、非線形のグリッド重複は前記の Tycko 法

20

に従う完全な球に関する一定体積と一定屈折率の場所とを示していることに注意。

【0070】各試料中の網赤血球の参照百分率は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) により推薦されている手動の顕微鏡法を用いることにより決定される。この方法においては小体積の試料が調製され、試料中の網赤血球の百分率は顕微鏡を使って計数する。その顕微鏡は $100\times$ 油浸対物レンズと $10\times$ 接眼レンズとを備えている。各試料について最少 1000 個の細胞を数える。計数精度を改善するためにミラーディスクを顕微鏡接眼レンズ中に挿入する。染色後青色物質の 2 つまたはそれ以上を含有する赤色細胞はどれも網赤血球と分類する。

【0071】患者試料の網赤血球数はこの流通式細胞測定技術により 2.3% と測定された。同じ血液試料が NCCLS 法でも分析された。その結果は網赤血球数 1.7% であった。

【0072】第 2 の実験が、細胞を、ニューメチレンブルーで染色し、散乱/吸収流通式細胞測定器で測定した場合の網赤血球と赤血球との個体群間の弁別のために行われた。緩衝剤処方オキサジン 750 を含有する試薬組成物に対するものと同じである。オキサジン 750 をおきかえた。作業試薬中のニューメチレンブルー染料の濃度は $60 \mu\text{g/ml}$ である。前記の試料調製および分析案を踏襲した。しかし、顕微鏡調査では、赤色細胞と網赤血球とはオキサジン 750 混合物におけるより球形化されていないことが示めされた。その分析からの粗データは赤色散乱対赤色吸収サイトグラム (図 5 の

(1)) の形で表示される。図 4 の (1) に比較して、多分方向雑音のために、吸収および散乱信号ともより広がっていることに注意。赤血球と網赤血球との間の吸収区画に基き、患者試料の網赤血球数は 2.2% と測定された。NCCLS 法で分析すると、網赤血球 1.7% を得た。

【0073】

【実施例 2】双性イオン界面活性剤を含有する、実施例 1 の試薬組成物を用いる、血液試料中の網赤血球と赤血球とを区別するための散乱/吸収測定

2 つめの実験セットが実施例 1 の試薬組成物を用いて、しかし、その上に赤色血液細胞と網赤血球を等積的に球形化するために双性イオン界面活性剤を含有させて行われた。

【0074】各実験に対し、作業試薬は試薬中の界面活性剤の最終濃度 $63 \mu\text{g/ml}$ であるように、試薬組成物に界面活性剤ラウラミドプロピルベタインを添加して作った。

【0075】実施例 1 に関し記載したような試料調製に従った。顕微鏡を通して見ると、調製された試料中の成熟赤色細胞と網赤血球とは完全に球形化され、網赤血球

(11)

21

は染色されていることが示めされた。球形化の完全さの増加と共に方向雑音の低減さの増加を示す図 14、図 15、図 4～図 7 の差異に注意。

【0076】図 6 の (1) は細胞をオキサジン 750 染料および前記界面活性剤を含有する試薬組成物で染色した場合の、網赤血球と赤血球との個体群間の区別のより高い度合を示している。図 16 において未染色対照、領域 B には細胞がないことに注意。

【0077】患者試料の網赤血球数はこの技術で 8.0 % と測定された。同じ血液試料はまた NCCLS 法でも分析された。その結果は網赤血球 9.1 % であった。

【0078】図 7 の (1) は細胞をニューメチレンブルー染料と前記の界面活性剤とを含有する試薬組成物で染色した場合の、網赤血球と赤血球との個体群間の区別の度合いを示している。

【0079】患者試料の網赤血球数はこの技術で 5.0 % と測定された。同じ血液試料はまた NCCLS 法で *

$$\text{吸収信号} = \text{擬似吸収} + \text{ヘモグロビン吸収} + \text{染料吸収}$$

【0081】成熟赤色血液細胞の擬吸収信号は典型的には染色された網赤血球からの実際の吸収信号と同じ大きさである。これが染色された網赤血球の未染色の赤色血液細胞との、吸収サイトグラムでの区別の度合を低下させている。吸収チャンネルの S/N 比は各赤色細胞および網赤血球吸収信号から擬吸収およびヘモグロビン吸収成分を除くために、信号を補正することにより改善でき ※

$$S_3 = \pi a^2 Q_{\text{ext}} - S(\lambda, n_s, \theta_3, \Delta\theta_3; V, HC)$$

この式で、a は球形化された細胞の半径であり、λ は励起 (または照明) 波長であり、η_s は試料流およびシースの屈折率であり、Q_{ext} は細胞の励起効率であって、擬吸収の場合は θ₃ = 0° で Δθ₃ = 19.5° である。S₃ の値は V および HC の凡ての予期される値に対し表にされている。

【0082】擬吸収補正は次の如く行う。まず Tycko において記載されるごとく、散乱-散乱サイトグラム ★

$$\begin{aligned} \text{染料吸収} &= \text{吸収信号} - \text{ヘモグロビン吸収} - \text{擬似吸収} \\ &= \text{吸収信号} - S_3 \end{aligned}$$

【0083】凡てのデータに関し、調整された値で、スレショールディングとフラギングに先立ち粗データパラメーターに替える。赤色散乱パラメーターが V-HC 図上に見えないどんな対象もデータ分析案では無視されている。このデータは図 10 と 11 との中で示されているように、補正された値を反映する赤色散乱対吸収サイトグラムで再表示される。

【0084】散乱/吸収流通式細胞測定器中に試料組成物を用いた場合のオキサジン 750 の性能を NCCLS 手動法と比較するための研究を行った。血液試料はその試薬組成物で染色した。同じセットの血液試料中の網赤

22

* も分析された。結果は網赤血球数 9.1 % であった。

【0080】

【実施例 3】擬吸収に対する補正を行った吸収データを用いる、本発明の試薬組成物および方法と NCCLS 参照法との関連研究

検出光学副次システムは流通セルでのレーザービームを通過する細胞からの散乱および未散乱光の両方を集める。細胞は凡ての方向に光を散乱する。前記した光学システム中の相対的 Hi-NA レンズは、19.5 度までの半角を持って光学軸の中央にある円錐中に散乱される光を受入れる。それ故、19.5 度より大きい角度に散乱される光は失われる。その結果、細胞吸収を測定しようとする場合、完全に非吸収の細胞は数%の入射光を吸収するように“見える”(擬吸収)。測定される吸収は次の如く表わされる。

【数 1】

20 ※。擬吸収およびヘモグロビン吸収の量は与えられるどんな細胞に対しても、前記の Tycko の特許中に記載の公知の Mie の光散乱理論を用いることにより計算できる。角度間隔 19.5° ~ 180° に対する散乱断面並にヘモグロビン吸収成分 S₃ は次のように計算できる。

【数 2】

★から、V と HC とを細胞からの 2 つの散乱信号から決定 30 しなければならない。それから S₃ を、測定された V と HC とに対するルックアップ表記載条項に見出し、吸収チャンネルにより測定された値から差引く。その結果が細胞の染色による実際の吸収である。測定された吸収信号は唯各細胞に関する染料吸収のみを残すため次の関係を用いて調整する。

【数 3】

40 血球を NCCLS 法を用いて計数した。

【0085】試料調製と分析案とは擬吸収補正を付加したほかは、実施例 2 に関し記載したものと同じである。顕微鏡を通して見ると調製した試料中の成熟赤血細胞と網赤血球とは完全に球形化されていて、網赤血球は染色されていることが判った。

【0086】これら 2 つの方法から得られた百分率網赤血球数を図 12 で比較する。試薬組成物中オキサジン濃度 2 μg/ml で、この試薬組成物と図 1 ~ 図 3 の流通式細胞測定装置とを用いた測定値と NCCLS 参照法により得られた測定値との間に密接な相関が存在すること 50

(12)

23

が示めされている。直交回帰分析により得られる、測定値の相関係数は 0.92 であった。

【0087】

【実施例 4】擬吸収に対する補正を行った吸収データを用いた吸収流通式細胞測定器と TECHNICON H¹ 参照法とに関する相関研究

擬吸収補正と適当なゲーティング (gating) との後、赤血球と網赤血球との指数 MCV と MCHC とを個別に測定し、散乱/吸収流通式細胞測定器に本発明の試薬組成物を用いて得られた値と TECHNICON H¹ 測定値との間を比較した。図 8 と図 9 とはそれぞれ全赤色血液細胞 MCV と MCHC とに関する相関を示している。

【0088】図 13 は網赤血球を HC 対 V サイトグラム中 “+” で示している。

【0089】前記の説明から明らかな、本発明の幾つかの有利さには、吸収流通式細胞測定技術による網赤血球と赤血球との体積とヘモグロビン含有量とヘモグロビン濃度との電子光学的同時定量的ための、全血試料調製用の試料組成物と方法とを含んでいる。

【0090】上記の見地から、本発明の幾つかの目的は達成され、他の有利な結果が得られることが判るであろう。

【0091】前記の構成と方法とにおいて本発明の範囲を逸脱することなく種々な変更が行われ得るから、上記の説明に含有され、あるいは付随する図面に示される凡ての事項は説明としてであって、限定する意味でないと解釈すべきものとする。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の原理を実行するための、散乱/吸収流通式細胞測定器の照明光学系の説明図である。

【図 2】本発明の原理を実行するための、散乱/吸収流通式細胞測定器の検出光学系の説明図である。

【図 3】本発明の原理を実行するための、散乱/吸収流通式細胞測定器の検出信号処理システムの説明図である。

【図 4】実施例 1 に従い、オキサジン 750 により染色された、部分的に球形化されている赤色血液細胞と網赤血球とを含有する前血試料についてのサイトグラムである。(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイトグラムである。

【図 5】実施例 1 に従い、ニューメチレンブルーにより染色された部分的に球形化されている赤色血液細胞と網赤血球とを含有する全血試料についてのサイトグラムである。(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイトグラムである。

【図 6】実施例 2 に従い、オキサジン 750 により染色された、完全に球形化された赤色血液細胞と網赤血球と

24

を含有する全血試料についてのサイトグラムである。

(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、
(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイトグラムである。

【図 7】実施例 2 に従い、ニューメチレンブルーにより染色された完全に球形化された赤色血液細胞と網赤血球とを含有する全血試料についてのサイトグラムである。

(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、
(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイト

10 グラムである。

【図 8】実施例 4 に従う、オキサジン 750 染料により染色されている網赤血球に関する、MCV の相関を示す。

【図 9】実施例 4 に従う、オキサジン 750 染料により染色されている網赤血球に関する、MCHC の相関を示す。

【図 10】実施例 3 に従う、擬似吸収補正をしたオキサジン 750 で染色された、完全に球形化された赤色血液細胞と網赤血球とを含有する全血試料に関するサイト

20 グラムである。(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイトグラムである。

【図 11】実施例 3 に従う、擬似吸収相関を持つ、ニューメチレンブルーで染色された、完全に球形化された赤色血液細胞と網赤血球とを含有する全血試料に関するサイトグラムである。(1) は赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、(2) は赤色光低角度散乱対赤色光高角度散乱のサイトグラムである。

【図 12】実施例 3 に従う、本発明の試薬を含有するオキサジン 750 と NCCLS 参照方法とを用いた、全血試料中に検出された網赤血球百分率の比較である。

【図 13】網赤血球 (+ 字で示す) と赤色細胞 (黒塗正方形で示す) とに関する、HC 対 V のサイトグラムである。

【図 14】未染色で球形化されていない赤色血液細胞に関する、赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムである。

【図 15】未染色で球形化されていない赤色血液細胞に関する、赤色光高角度散乱対赤色光低角度散乱のサイト

40 グラムである。
【図 16】未染色で球形化されている赤色血液細胞に関する、赤色光散乱対赤色吸収のサイトグラムであり、擬似吸収に対して補正してある。

【図 17】未染色で球形化されている赤色血液細胞に関する、赤色光高角度散乱対赤色光低角度散乱のサイト

【符号の説明】

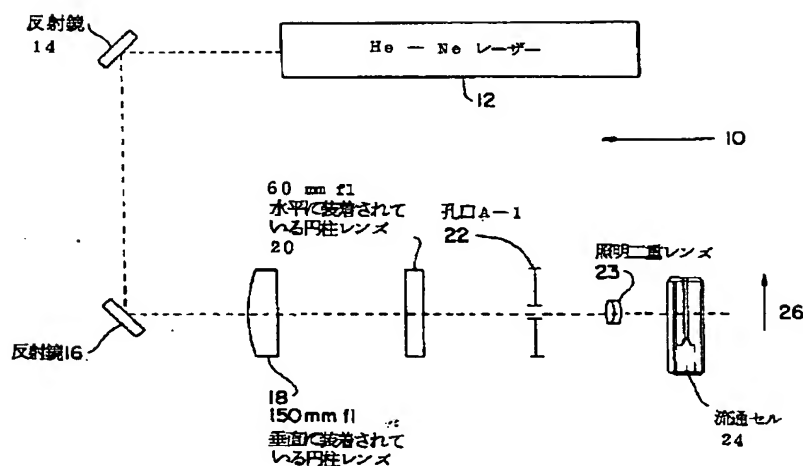
10 照明光学システム
12 He-Ne レーザー
14 反射鏡
50 16 反射鏡

(13)

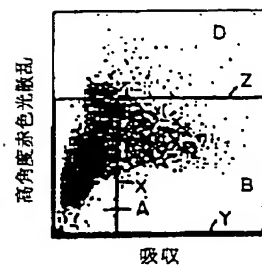
18 円柱レンズ
20 円柱レンズ
22 孔口

23 照明二重レンズ
24 流通セル
26 矢印

【図 1】



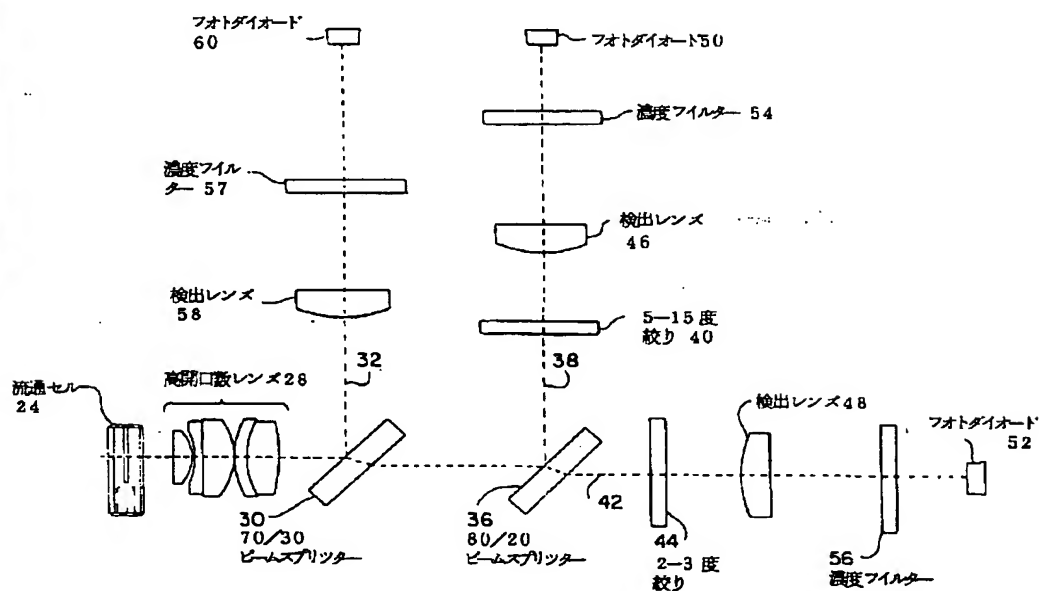
【図 14】



【図 15】

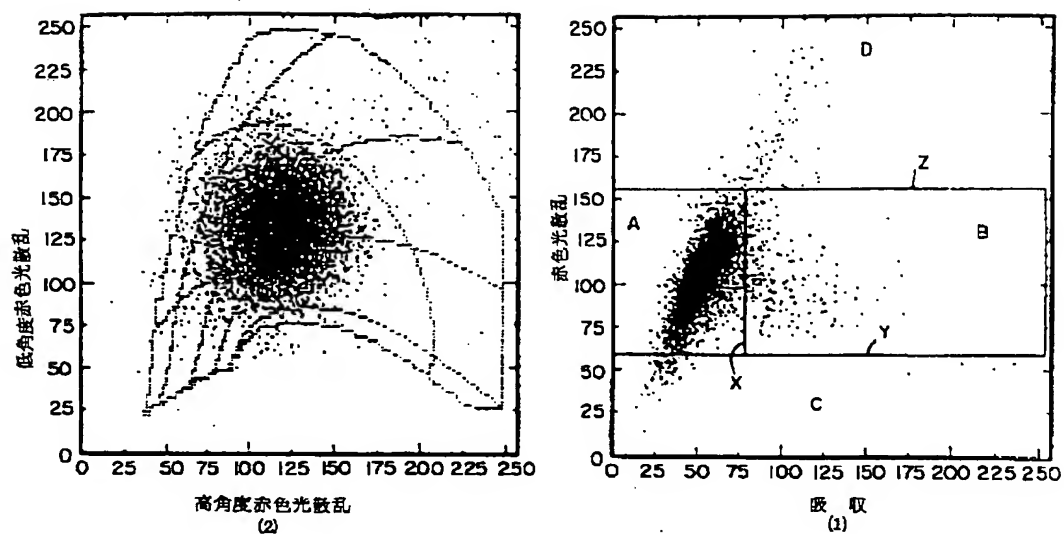


【図 2】

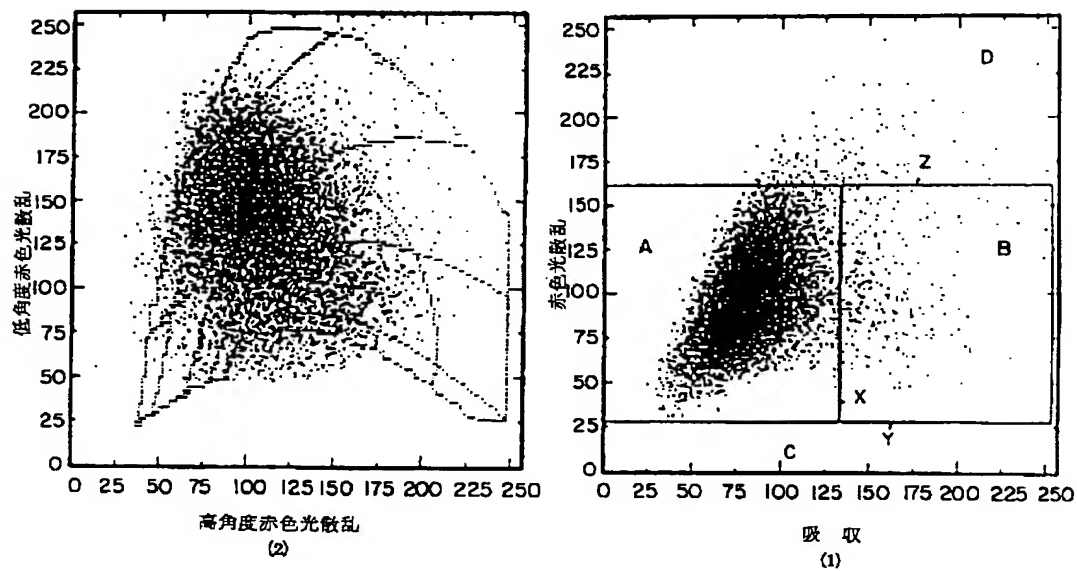


(14)

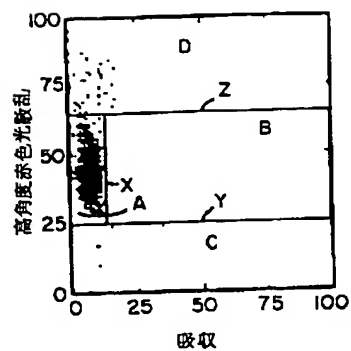
【图 4】



【图 5】

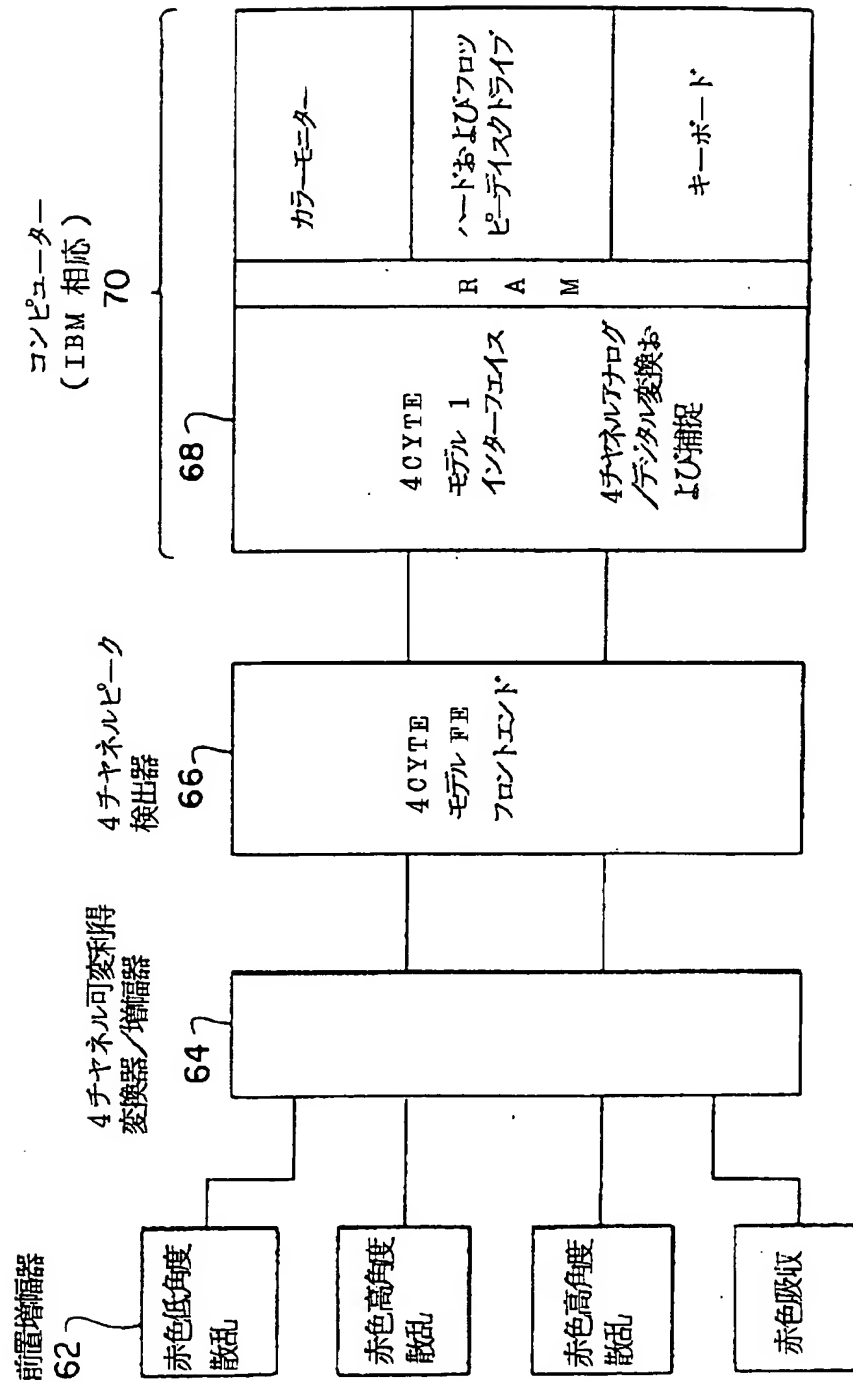


【图 16】



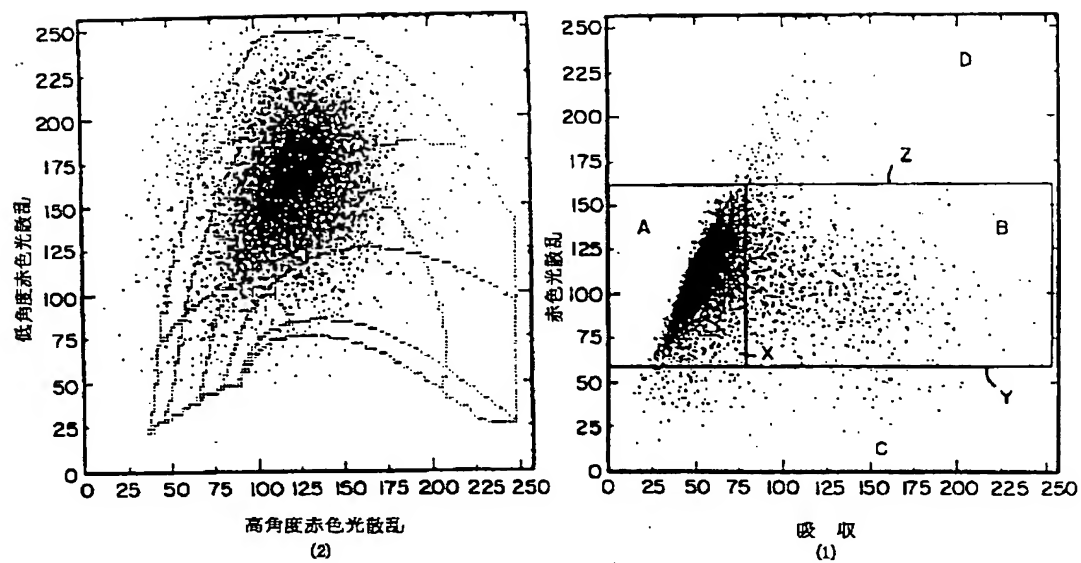
(15)

【図 3】

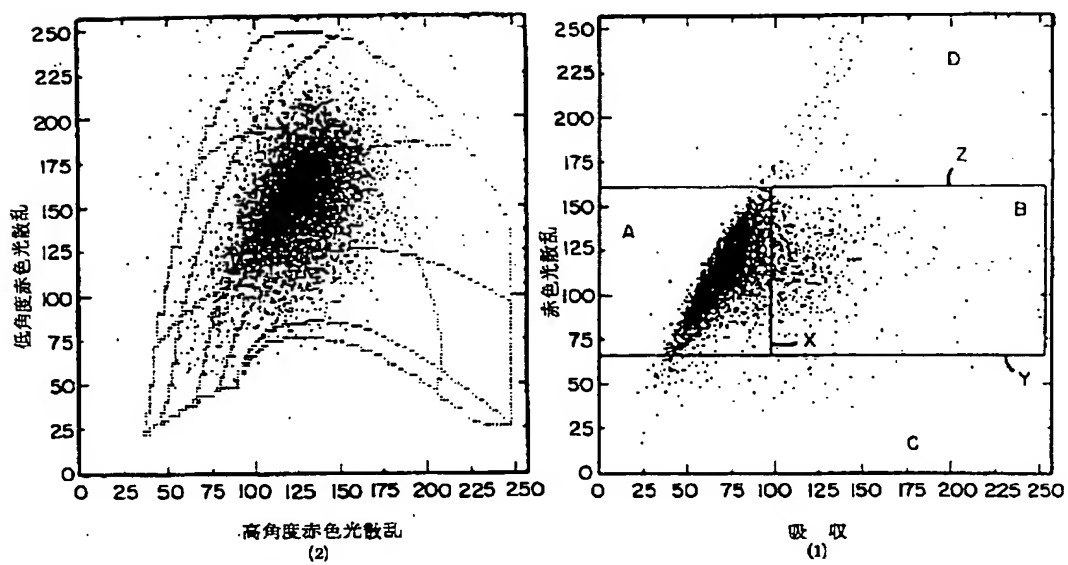


(16)

【图6】

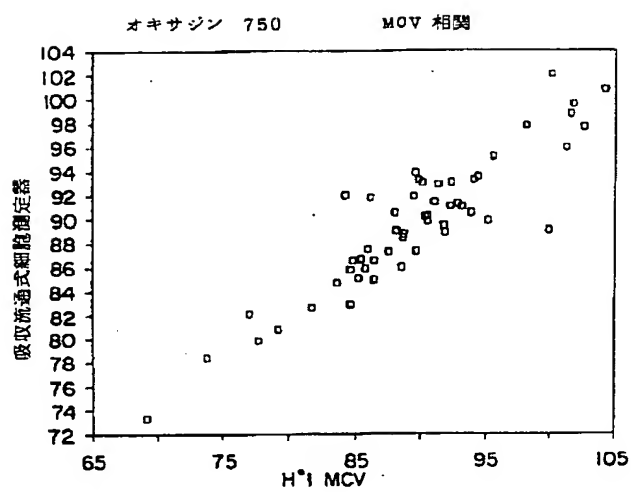


【图7】

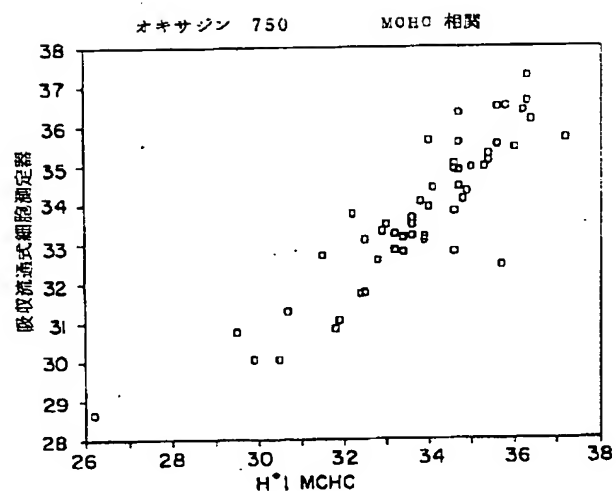


(17)

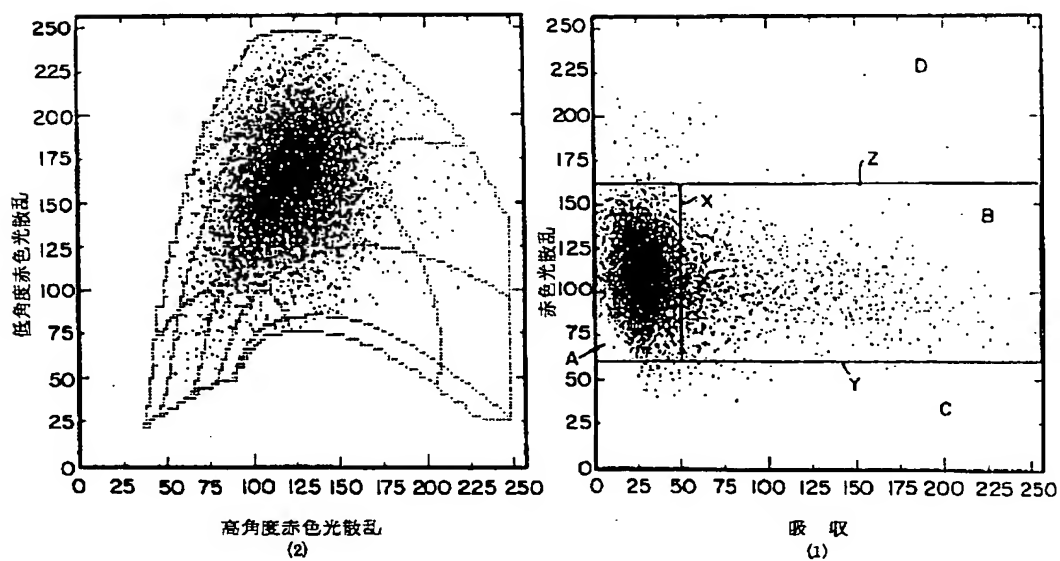
【図 8】



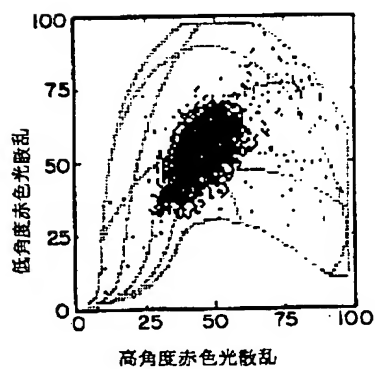
【図 9】



【図 10】

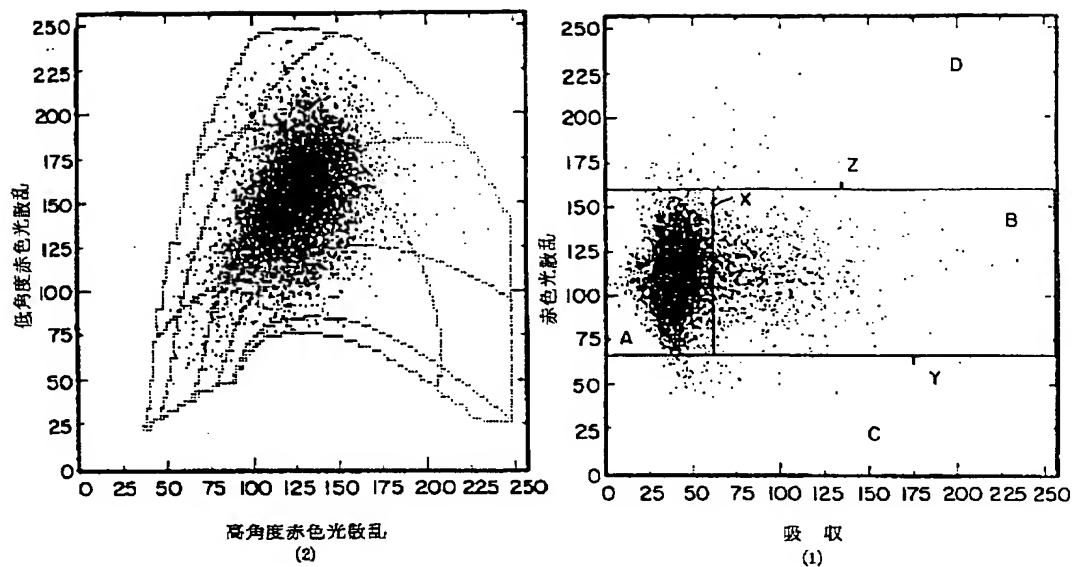


【図 17】

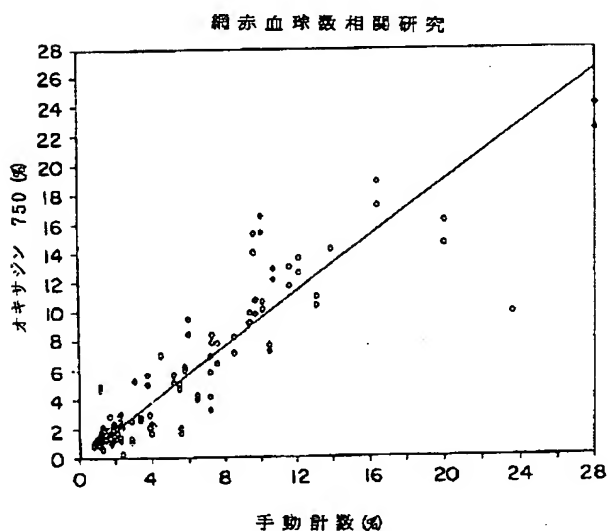


(18)

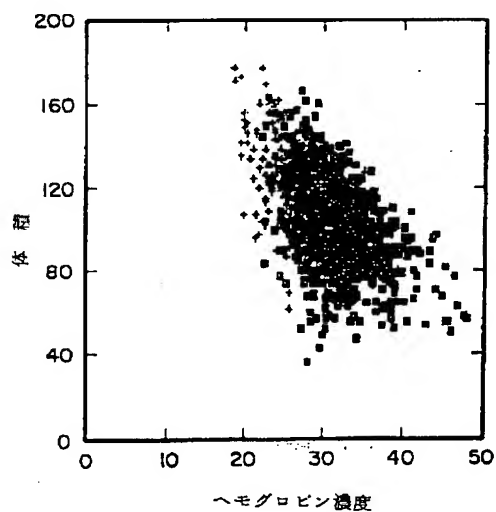
【図 11】



【図 12】



【図 13】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
G 0 1 N 33/68

識別記号 庁内整理番号

F I
G 0 1 N 33/68

技術表示箇所

(72) 発明者 ソフィー、エス、ファン
アメリカ合衆国ニューヨーク州10546、
ミルウッド、グレンウッド・ロード 21
番(72) 発明者 ダニエル、ベン・デイヴィッド
アメリカ合衆国ニューヨーク州10588、
シュラブ・オウク、アスペン・ロード
1335番

(19)

(72) 発明者 アルバト、キューボ
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10583、
 スカースデイル、ウインディング・レイ
 ン 11番

(72) 発明者 ジェナ、フィシア
 アメリカ合衆国ニュージャージー州
 07640、ハリングタン・パーク、ノー
 マ・ロード 144番

(72) 発明者 グレイス、イー、マーティン
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10549、
 マウント・キスコ、パーク・ドライヴ
 99番

(72) 発明者 レナド、オーンスタイン
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10607、
 ホワイト・ブレインズ、ビルタム・ロウ
 ド 5番

(72) 発明者 グレガリ、エム、コウレラ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州
 07003、ブルームフィールド、ニューエ
 ル・ドライヴ 61番